

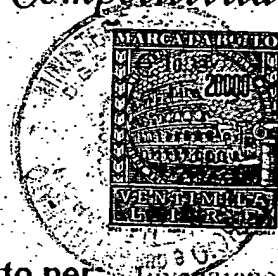


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: *Invenzione Industriale*

N. BAZ000 A 000020

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, Il 18 OTT. 2002

IL DIRIGENTE

Giorgio Romano

Ing. Giorgio Romano

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione CIPRIANI FRANCO PF
 Residenza TURI (BA) codice CPRFNE52R11A662B
 2) Denominazione GIGLI GIUSEPPE
 Residenza ROMA codice GGLGPP70S04H501D

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome LAFORGIA DOMENICO cod. fiscale LFRDNC51H22A662C
 denominazione studio di appartenenza STIM
 via GARRUBA n. 3 città BARI cap 70122 (prov) BA

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

**"Oligomeri del tiofene come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il ri-
 conoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche".**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

1) CIPRIANI FRANCO 3) CINGOLANI ROBERTO
 2) GIGLI GIUSEPPE 4) FAVARETTO LAURA

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>
2) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	<input checked="" type="checkbox"/> PROV	n. pag. <u>09</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	<input checked="" type="checkbox"/> PROV	n. tav. <u>1</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		designazione inventore
Doc. 5)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<input checked="" type="checkbox"/>		nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale lire TRECENTOQUINDICIMILA

COMPILATO IL 13/10/2000

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI BARI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

BACCA000020

Reg. A.

L'anno millenovecento duemila, il giorno trentuno, del mese di maggio

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. _____

_____ fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

L. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
ANNA RIZZO

A. RICHIEDENTE (I)

Q3	Denominazione	CINGOLANI ROBERTO	NG PF
	Residenza	LECCE	codice CNGR,RT61,T23,F20,5J
Q4	Denominazione	FAVARETTO LAURA	PF
	Residenza	OZZANO EMILIA (BO)	codice FVRL,RA65,R45,H29,4G
Q5	Denominazione	ZAMBIANCHI MASSIMO	PF
	Residenza	CESENA	codice ZMBM,SM,66,D1,OD,70,4A
Q6	Denominazione	SOTGIU GIOVANNA	PF
	Residenza	BOLOGNA	codice STGG,NN,70,R4,4B,35,4P
Q7	Denominazione	BARBARELLA GIOVANNA	PF
	Residenza	BOLOGNA	codice BRBG,NN,41,T6,7E,80,5J
Q8	Denominazione	CITRO GENNARO	PF
	Residenza	ROMA	codice CTRG,NR,46,R1,6F,83,9G

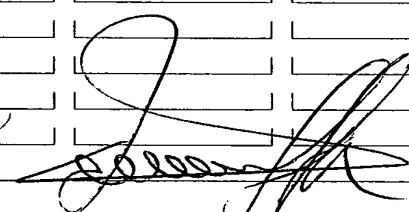
E. INVENTORI DESIGNATI

	cognome nome	cognome nome
Q5	ZAMBIANCHI MASSIMO	
Q6	SOTGIU GIOVANNA	
Q7	BARBARELLA GIOVANNA	
Q8	CITRO GENNARO	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE
					Data N° Protocollo

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA BA 00 A 000 020

REG. A

DATA DI DEPOSITO / /

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO / /

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione ROBERTO CINGOLANI ET AL.

Residenza LECCE

D. TITOLO

"OLIGOMERI DEL TIOFENE COME MARCATORI FLUORESCENTI AD ALTA EFFICIENZA PER IL RICONOSCIMENTO E L'ANALISI QUANTITATIVA DI MOLECOLE BIOLOGICHE".

Classe proposta (sez./cl./scl) / /

(gruppo/sottogruppo) / /

L. RIASSUNTO

Oligomeri del tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche. Secondo ulteriori aspetti il trovato è caratterizzato, inoltre, dalla funzionalizzazione di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri; dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane; dalla funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto; dall'uso dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e citofluorimetria di soluzioni.

M. DISEGNO





Descrizione tecnica sintetica dell'invenzione industriale dal titolo:

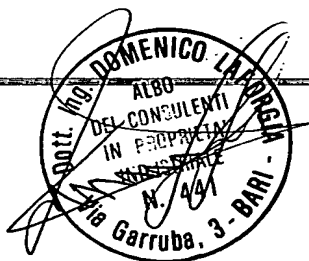
Oligomeri del tiofene come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche

5 di Giovanna Barbarella, Laura Favaretto, Giovanna Sotgiu, Massimo Zambianchi, Roberto Cingolani, Giuseppe Gigli, Franco Cipriani, Gennaro Citro, a mezzo mandatario studio STIM ing. Domenico LAFORGIA ed elettivamente domiciliato agli effetti di legge in Bari, Via Garruba n. 3.

10

Oligomeri del tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche. Secondo ulteriori aspetti il trovato è caratterizzato, inoltre, dalla funzionalizzazione di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri; dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane; dalla funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto; dall'uso dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e citofluorimetria di soluzioni.

15
20
25





Descrizione tecnica dell'invenzione industriale dal titolo:

Oligomeri del tiofene come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche

5 Di Giovanna Barbarella, Laura Favaretto, Giovanna Sotgiu, Massimo Zambianchi, Roberto Cingolani, Giuseppe Gigli, Franco Cipriani, Gennaro Citro, a mezzo mandatario studio STIM ing. Domenico LAFORGIA ed elettivamente domiciliato agli effetti di legge in Bari, Via Garruba n. 3.

10

Forma oggetto del presente brevetto la funzionalizzazione dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene da impiegarsi come marcatori di specie biologiche in diagnostica chimica quantitativa.

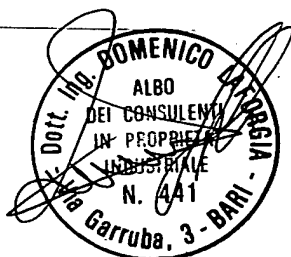
15 Allo stato attuale esistono poche molecole organiche fluorescenti che possono essere usate come markers per molecole biologiche e diagnostica chimico/medica. Le più comuni sono la fluoresceina, la rodamina e i loro derivati che emettono nel verde e nel rosso. Dette molecole presentano alcuni inconvenienti, ed in particolare, la mancanza di molecole fluorescenti con caratteristiche di: alta
20 efficienza; accordabilità cromatica e capacità di legarsi in maniera covalente alle molecole biologiche, impedisce di fatto l'uso di spettroscopie e citofluorimetrie avanzate per la misura parallela di numerose specie biologiche e di reazioni diverse simultaneamente. Infatti, a fronte di un vasto repertorio di tecniche biologiche che
25 permettono di marcare differenti siti di un biopolimero, non esiste

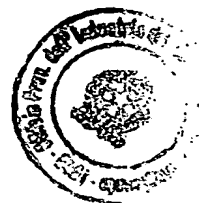




tuttora un numero sufficientemente grande di fluorofori che emettano su un ampio intervallo di frequenze (colori) permettendo così l'uso estensivo delle tecniche spettrofluorimetriche per la diagnostica biochimica e/o biomedica.

- 5 In tale contesto, la necessità di misurare più indicatori biologici simultaneamente rende necessario lo sviluppo di nuovi marcatori fluorescenti per l'analisi di reazioni biologiche complesse. Lo sviluppo di nuove molecole fluorescenti che emettono nel visibile con alta efficienza è pertanto di grande importanza. Per esempio,
- 10 fluorofori che emettono su diversi colori e capaci di legarsi covalentemente a proteine potrebbero essere impiegati nella preparazione di kit diagnostici per rivelare simultaneamente la presenza di piccole quantità di diversi antigeni in campioni biologici liquidi.
- 15 Gli oligomeri del tiofene sono noti materiali semiconduttori con grande potenzialità di applicazione nel campo degli emettitori di luce (LED) e dei dispositivi elettronici (FET) organici e come precursori per la preparazione di politiofeni. Tali composti sono caratterizzati da una alta efficienza di emissione sia in soluzione
- 20 che nello stato solido.
- L'efficienza di emissione in soluzione dipende dalla lunghezza dell'oligomero, e può raggiungere valori massimi di 60% (sexitiofene non sostituito). Sfortunatamente però, gli oligotiofeni non sostituiti sono scarsamente solubili, e sin'ora non è stato
- 25 possibile impiegarli come marcatori per molecole biologiche in





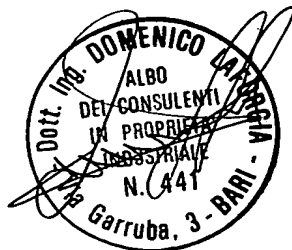
soluzione.

Il trovato oggetto della presente invenzione risolve i problemi tecnici sopra menzionati in quanto trattasi di oligomeri del tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta
5 efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche.

Secondo ulteriori aspetti il trovato è caratterizzato, inoltre, dalla funzionalizzazione (cioè dal miglioramento della funzione di una molecola per mezzo di sostituzioni con opportuni gruppi chimici)
10 di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri; dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane; dalla
15 funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto; dall'uso dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e
20 citofluorimetria di soluzioni, che rimpiazzano i coloranti convenzionali operanti su pochi colori fissi.

Questi ed altri vantaggi appariranno nel corso della descrizione dettagliata dell'invenzione che si ritiene, comunque, del tutto esemplificativa e non limitativa.

25 Gli oligomeri del tiofene hanno una grande efficienza di





fluorescenza in soluzione, dipendentemente dal solvente, dalla temperatura e dallo stato di aggregazione. La frequenza dell'emissione (colore della fluorescenza) può essere variata finemente mediante la funzionalizzazione selettiva delle posizioni
5 alfa e beta della catena aromatica e/o dello zolfo tienilico. In questo modo derivati degli oligotiofeni con diversi colori di fluorescenza possono essere simultaneamente eccitati da una stessa sorgente di luce ultravioletta. Tali composti possono inoltre essere funzionalizzati con gruppi capaci di legarsi covalentemente
10 alle molecole biologiche. Sulla base di queste proprietà proponiamo l'uso degli oligomeri del tiofene funzionalizzati come marcatori fluorescenti per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche in diagnostica medica e biochimica.

15 Gli oligomeri del tiofene possono essere resi solubili in solventi organici e/o acqua mediante un'appropriata funzionalizzazione delle posizioni alfa e beta della catena aromatica. Inoltre la funzionalizzazione dello zolfo tienilico al corrispondente S,S-diossido causa un forte incremento dell'efficienza quantica di
20 emissione, permettendo così di ottenere una nuova classe di molecole che possono essere usate anche per la marcatura fluorescente di campioni biologici.

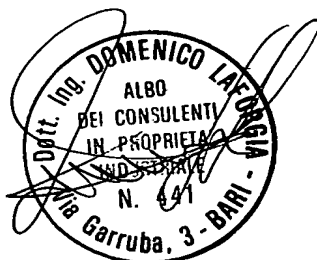
Il presente brevetto riguarda quindi una nuova classe di oligomeri del tiofene funzionalizzati nella catena aromatica e allo zolfo
25 tienilico da impiegarsi come marcatori fluorescenti di molecole





biologiche e polimeri. La gap ottica e la frequenza di emissione degli oligomeri del tiofene dipendono dalla coniugazione $\pi - \pi$ della catena aromatica. Tale coniugazione può essere finemente variata cambiando l'angolo diedro fra gli anelli adiacenti della molecola (0 e 180 gradi corrispondono al massimo overlap e all'emissione rossa mentre 90 gradi corrisponde al minimo overlap e all'emissione blue). La scelta della natura e della posizione dei sostituenti permettono la sintesi di composti con efficienza di fluorescenza molto alta in soluzione e colore della fluorescenza variabile a piacimento nell'intero spettro visibile e vicino infrarosso. Inoltre, la grande stabilità chimica e la facilità di funzionalizzazione, permettono l'introduzione di una grande varietà di gruppi funzionali, inclusi quelli capaci di formare legami covalenti con acidi nucleici, peptici e proteine. In questo modo gli oligomeri del tiofene possono essere funzionalizzati con specie diverse in modo da potersi legare covalentemente alle molecole biologiche, ed emettere un'intensa fluorescenza di colore predeterminato.

Gli oligomeri del tiofene vengono funzionalizzati con gruppi del tipo: NCS, NH₂, CHO, COOH, SH. I blocchi contenenti questi gruppi vengono preparati e assemblati allo scopo di ottenere oligomeri di lunghezza voluta. Alternativamente gli oligomeri di lunghezza desiderata possono prima essere sintetizzati e poi funzionalizzati con i gruppi menzionati. Le proprietà optoelettroniche di emissione, efficienza e accordabilità cromatica





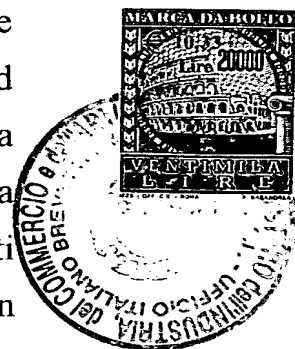
sono standardizzate rispetto ai cambiamenti dell'ambiente
circostante (che influenza la ricombinazione non-radiativa e
l'emissione dei fluorofori mediante intersystem crossing a tempi di
vita degli stati di tripletto), per mezzo di un controllo fine del PH
5 della soluzione, della concentrazione di ioni e del tipo di solvente.
I fluorofori a base di tiofene per la marcatura di molecole
biologiche hanno i seguenti vantaggi: alta efficienza di
fluorescenza in soluzione; ampia variazione di colori della
fluorescenza dal visibile al vicino infrarosso, ottenuta mediante
10 piccole modificazioni della struttura molecolare; stessa natura
chimica per tutti i marcatori, indipendentemente dal colore della
fluorescenza, che permette la standardizzazione delle procedure di
funzionalizzazione (diversamente dai fluorofori convenzionali che
richiedono una chimica specifica da sviluppare caso per caso);
15 possibilità di eccitare tutti i marcatori fluorofori simultaneamente
mediante una unica sorgente luminosa ultravioletta; alta stabilità
chimica dei fluorofori grazie alla funzionalizzazione dello zolfo
tienilico; possibilità di immobilizzare fluorofori con più di un
gruppo sostituito sulle macromolecole biologiche e incrementare
20 ulteriormente l'efficienza di fluorescenza, permettendo così di
misurare dosaggi estremamente bassi; possibilità di misurare in
parallelo e simultaneamente diverse specie chimiche mediante
fluorofori funzionalizzati operanti su diversi colori. Questo diventa
uno strumento nuovo e potente che migliora sensibilmente gli
25 attuali limiti della citofluorimetria quantitativa.





Infatti, un esempio dettagliato di realizzazione dell'invenzione è proprio quello relativo alla marcatura cromogena di molecole biologiche per scopi biodiagnostici. Attualmente si usano delle molecole fluorofere che vengono legate a diversi tipi di cellule (ad esempio, globuli bianchi o rossi, anticorpi, albumina, ecc.). La luce emessa dalle cellule marcate (di diverso colore a seconda della molecola fluorofora legata) viene misurata da apparati spettroscopici chiamati citofluorimetri in modo da avere un conteggio quantitativo delle cellule. Tale tecnica, comunemente denominata citofluorimetria, è alla base di tutte le tecniche di analisi comuni (ad esempio, analisi del sangue).

La molecola oggetto della presente invenzione ha il vantaggio di poter emettere su molte frequenze diverse permettendo così la marcatura di diverse cellule simultaneamente nella stessa soluzione. In questo modo è possibile fare della citofluorimetria quantitativa "parallela", marcando cioè molte più cellule simultaneamente di quanto si possa fare coi fluorofori convenzionali, grazie alla accordabilità in frequenza dei tiofene modificati. Nella pratica di laboratorio, la molecola di tiofene è legata alla cellula da marcare con gruppi isocianati. La cellula così marcata è eccitata da una sorgente di luce ultravioletta ed emette la radiazione specifica del tiofene ad essa legato.





RIVENDICAZIONI

- 1) Oligomeri di tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche.
- 2) Oligomeri di tiofene secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dalla funzionalizzazione di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri.
- 3) Oligomeri di tiofene secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzati dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane.
- 4) Oligomeri di tiofene secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzati dalla funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto.
- 5) Uso di fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e citofluorimetria di soluzioni.
- 6) Oligomeri di tiofene secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzati da quanto precedentemente descritto.





AGENCY AUTHORIZATION

RECEIVED
AUG 13 2002
TECH CENTER 1801-2900

Title of Application: **FUNCTIONALIZED THIOPHENE OLIGOMERS AND THEIR
USE AS FLUORESCENT MARKERS**

U.S. Attorney's Reference No.: 13706

I hereby authorize the registered attorneys and agents of the firm of
SHELDON & MAK PC
who are attorneys of record in this case, to accept and follow the instructions they receive
from my/our local patent agents (from whom they received this
case) as to any action to be taken in the U.S. Patent and Trademark Office without direct
communications between these U.S. Attorneys/Agents and the undersigned.

ASSIGNEE

May 28, 2002

(Date)

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

(Name) **Lucio BIANCO**

(Title) **President**

ISTITUTO NAZIONALE PER LA FISICA
DELLA MATERIA

(Date)

(Name)

(Title)

BIO-D S.r.l.

(Date)

(Name)

(Title)

AGENCY AUTHORIZATION

Title of Application: **FUNCTIONALIZED THIOPHENE OLIGOMERS AND THEIR
USE AS FLUORESCENT MARKERS**

U.S. Attorney's Reference No.: 13706

I hereby authorize the registered attorneys and agents of the firm of
SHELDON & MAK PC

who are attorneys of record in this case, to accept and follow the instructions they receive
from my/our local patent agents (from whom they received this
case) as to any action to be taken in the U.S. Patent and Trademark Office without direct
communications between these U.S. Attorneys/Agents and the undersigned.

ASSIGNEE

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

(Date)

(Name)

(Title)

ISTITUTO NAZIONALE PER LA FISICA

DELLA MATERIA

May 12, 2002

(Date)

INFM
IL PRESIDENTE
(Prof. Flavio Toigo)

(Name) FLAVIO TOIGO

(Title) PRESIDENT

BIO-D S.r.l.

(Date)

(Name)

(Title)

AGENCY AUTHORIZATION

Title of Application: **FUNCTIONALIZED THIOPHENE OLIGOMERS AND THEIR
USE AS FLUORESCENT MARKERS**

U.S. Attorney's Reference No.: 13706

I hereby authorize the registered attorneys and agents of the firm of
SHELDON & MAK PC

who are attorneys of record in this case, to accept and follow the instructions they receive
from my/our local patent agents (from whom _____ they _____ received this
case) as to any action to be taken in the U.S. Patent and Trademark Office without direct
communications between these U.S. Attorneys/Agents and the undersigned.

ASSIGNEE

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

(Date)

(Name)

(Title)

ISTITUTO NAZIONALE PER LA FISICA
DELLA MATERIA

(Date)

(Name)

(Title)

BIO-D S.r.l.

May 26, 2002

(Date)

(Name) **Francesco CIPRIANI**

(Title) **Sole Manager**

BIO D S.r.l.
Amministratore Unico
Dr. Francesco CIPRIANI